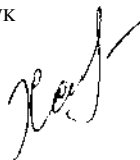


ХАРИТОНОВА МАЙЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ
СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ**

03.00.07 - микробиология

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Харитонова'.

КАЗАНЬ - 2003

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов
Казанского государственного университета им В.И. Ульянова - Ленина

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
с.н.с. **Л.В. Знаменская**

Научный консультант: доктор биологических наук,
проф. И.Б. **Лещинская**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
проф. С.В. Костров

доктор биологических наук,
проф. В.П. Коксин

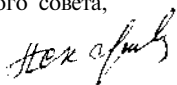
Ведущая организация: Институт микробиологии, АН РАН,
Москва

Защита диссертации состоится 2 октября 2003 г. в _____ часов на заседании
Диссертационного Совета Д 212.081.08. при Казанском государственном
университете им. В.И. Ульянова - Ленина, 420008 г. Казань, ул.
Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского
государственного университета

Автореферат разослан _____ 2003 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



А.Н. Аскарова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Рибонуклеазы представляют собой обширный класс ферментов, осуществляющих деполимеризацию рибонуклеиновых кислот. Внеклеточные рибонуклеазы, синтезируемые практически всеми видами бактерий, проявляют широкий спектр биологической активности. Бациллярные РНКазы обладают противовирусным эффектом (Куриненко и др., 1995; Liu and Altman, 1995; Kilani and Liu, 1999; Trang et al., 2000; Kilani et al., 2000; Hsu et al., 2000), мутагенными и антимутагенными свойствами (Ilinskaya et al., 1995; Ivanchenko et al., 1997), мембранотропным, цитотоксическим и противоопухолевым действием (Куриненко и др., 1988; Kurinenko et al., 1998; Prior et al., 1996; Калачева и др., 1997; Ilinskaya et al., 2001; Makarov and Ilinskaya, 2003). В малых дозах они являются стимуляторами роста и физиологической активности растений и микроорганизмов (Ильинская, Крылова, 1993; Колпаков и др., 1996, 2000; Егоров, 2003). Обнаружение РНКаз с новыми свойствами позволит создать препараты, обладающие разными видами биологической активности.

В соответствии с особенностями расщепления фосфодиэфирных связей в молекулах РНК рибонуклеазы подразделяются на две группы: гидролазы, расщепляющие 3'-фосфодиэфирные связи с образованием продуктов с 5'-терминальным фосфатом, и фосфотрансферазы, расщепляющие 5'-фосфодиэфирные связи, осуществляя последовательно две реакции: трансфосфорилирование с образованием нуклеотид-2',3'-циклофосфатов и гидролиз нуклеозидциклофосфатов до нуклеозид-3'-монофосфатов.

К настоящему времени известно, что бактерии могут секретировать рибонуклеазы обоих типов: низкомолекулярные гуанилспецифичные циклизирующие рибонуклеазы, состоящие из ~110 аминокислот, и высокомолекулярные рибонуклеазы, содержащие ~240 аминокислот. Гуанилспецифичные циклизирующие рибонуклеазы *Bacillus amyloliquefaciens*, *B.intermedius*, *B.pumilus*, *B.thuringiensis*, *B.circulans*, *B.coagulans* и *B.polymyxa* выделены в гомогенном состоянии и детально изучены. Клонированы гены, исследованы механизмы регуляции синтеза, а также механизмы действия большинства из них (Hartley and Rogerson, 1972; Лещинская, 1975; Лещинская и др., 1991, 1993; Афанасенко и др., 1979; Карпейский и др., 1981; Нуркиянова и др., 1989; Знаменская и др., 1984, 1994, 1995, 1998, 1999; Струминская и др., 1992; Деменьтьев и др., 1993; 1996; Yakovlev et al., 1993, 1994, 1998; Hartley, 1997; Шульга и др., 1994, 2000; Вершинина, Знаменская, 2002).

РНКазы второго типа выделены пока только из двух видов бактерий: РНКазы Bsn из *B.subtilis*, описанная Накамура с соавторами (Nakamura et al., 1994), и биназа II из *B.intermedius*, обнаруженная учеными Казанского университета Е.Р. Ханен и

Л.В. Знаменской (Nahnen et al., 2000). Первый фермент охарактеризован как Mg^{2+} -активируемая РНКазы, расщепляющая РНК до олигонуклеозид-5'-фосфатов (Nakamura et al., 1994). Способность *B.intermedius* секретировать помимо гуанилспецифичной рибонуклеазы (биназа I) высокомолекулярную рибонуклеазу (биназа II) была обнаружена при клонировании фрагмента хромосомы *B.intermedius* в клетках *B.subtilis*. Впоследствии было установлено, что биназа II является аналогом РНКазы Bsp из *B.subtilis*.

Таким образом, **циклизирующие** рибонуклеазы, образующие при расщеплении РНК продукты с 3'-**терминальным** фосфатом, обнаружены у многих видов бацилл и подробно изучены. РНКазы, продуцирующие **нуклеозид-5'-фосфаты**, к началу выполнения настоящей работы были обнаружены только у одного вида бактерий - *B.subtilis*. Вместе с тем известно, что внутриклеточные 5'-фосфат образующие РНКазы играют центральную роль в клеточном развитии и формировании ответов на изменения окружающей среды. К биологическим функциям РНКаз такого типа относится специфичный процессинг предшественников рРНК, тРНК и мРНК в прокариотических клетках (Young and Steitz, 1978; Altaian and Kirsebom, 1999), а в случае эукариот - это участие в процессах роста и дифференцировки (Ohtsuki et al., 1977; Grummt et al., 1979; Xu et al, 1990).

Нам представлялось интересным изучить физико-химические и каталитические свойства, а также закономерности регуляции синтеза высокомолекулярных бациллярных РНКаз, кардинально отличающихся от широко известных гуанилспецифичных РНКаз.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы было установление механизмов регуляции синтеза высокомолекулярных **рибонуклеаз** бацилл и характеристика ключевых свойств нового фермента - рибонуклеазы *Bacillus intermedius* - биназы II.

В работе решались следующие задачи:

1. Анализ структуры генов высокомолекулярных рибонуклеаз *Bacillus subtilis* (РНКазы Bsp) и *Bacillus intermedius* (биназы II).
2. Поиск генов, гомологичных генам РНКазы Bsp и биназы II, у представителей рода *Bacillus*
3. Изучение физиолого-биохимических механизмов регуляции синтеза высокомолекулярных рибонуклеаз *B.subtilis* и *B.intermedius*.
4. Выяснение возможной роли сенсорно-сигнальной системы DegS-DegU в регуляции экспрессии генов рибонуклеаз, а также альтернативного σ^E -фактора РНК-полимеразы в регуляции экспрессии гена РНКазы Bsp.
5. Разработка схемы получения препарата высокоочищенного фермента - биназы II.

6. Изучение физико-химических и каталитических свойств биназы II.

Научная новизна работы. Впервые с помощью дот-блот гибридизации гена биназы II с ДНК других видов бацилл, а также анализа известных нуклеотидных последовательностей, показано существование новых генов, гомологичных генам высокомолекулярных РНКаз Bsn и биназы II, у *B.thuringiensis*, *B.circulans*, *B.polymixa*, *B.amyloliquefaciens*, *B.anthraxis* и *Oceanobacillus iheyensis*. Определены физиолого-биохимические механизмы регуляции синтеза высокомолекулярных секретируемых рибонуклеаз *Bacillus subtilis* (РНКазы Bsn) и *Bacillus intermedius* (биназа II). Установлено, что синтез ферментов происходит в стадию замедления роста бактерий при фосфатном голодании. Определены условия, обеспечивающие максимальную продукцию ферментов. Обнаружена активация синтеза РНКазы Bsn и биназы II актиномицином Д - ингибитором транскрипции. Впервые установлено, что экспрессия генов РНКазы Bsn и биназы II регулируется на уровне транскрипции белком DegU двухкомпонентной регуляторной системы трансдукции сигнала DegS-DegU. Проведено выделение биназы II из культуральной жидкости рекомбинантных штаммов *B.subtilis* с плазмидой pJF28. Изучены физико-химические и каталитические свойства фермента. Данная работа существенно расширила представления о новой группе бациллярных ферментов — высокомолекулярных 5'-фосфат образующих РНКаз.

Практическая ценность работы. Получен рекомбинантный штамм *B.subtilis* - продуцент РНКазы Bsn, уровень синтеза фермента в котором в 17 раз превышает активность исходного бациллярного штамма. Подобраны условия культивирования, обеспечивающие максимальный синтез высокомолекулярных секретируемых рибонуклеаз *B.subtilis* и *B.intermedius*. Показана возможность использования актиномицина Д для увеличения выхода РНКазы Bsn и биназы II. Разработан метод выделения и очистки биназы II из культуральной жидкости рекомбинантных штаммов *B.subtilis* с плазмидой pJF28.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы были доложены на конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам "Ломоносов - 2000" (Москва, 2000 г.), XXXVIII и XXXIX международных научных конференциях "Студент и научно-технический прогресс" (Новосибирск, 2000, 2001 г.г.), научных конференциях молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КГУ "Материалы и технологии XXI века" (Казань, 2000, 2001 г.г.), 5-ой и 7-ой Пушкинских открытых конференциях молодых ученых "Биология - наука 21^{го} века" (Пушино, 2001, 2003 г.г.), итоговой научной конференции Казанского государственного университета (Казань, 2003 г.), на конгрессе FEMS "Бациллы" (Любляна, Словения, 2003 г.)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 170 страницах машинописного текста; состоит из обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела экспериментальных исследований, обсуждения результатов, выводов, списка литературы и приложений. Работа содержит 17 таблиц, 20 рисунков. Список литературы включает 325 источников.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали штаммы: *B.subtilis* 168 (*trpC2*), *B.subtilis* 3922 (*hisB2; trpC2; leuB*), полученные из коллекции микроорганизмов лаборатории синтеза и биоинженерии ферментов КГУ; штамм *B.subtilis* 8G5 (*trpC2; tyr; his; nic; ura; rib; met; ade*; lacks the *sipP* genes), штамм *B.subtilis* 8G5 *degS-degU* (like 8G5; *degS-degU; Km^r*), штамм *B.subtilis* 8G5 *degU32*(Hy) (like 8G5; *degU32*(Hy); *Km^r*), предоставленные ван Дижлом (Jan Maarten van Dijl, университет Гронингена, Нидерланды); штамм *B.subtilis* SEC84 (*sigEA84, Kan^R*), *B.subtilis* RL1059 (*spoIII^E::spc*), предоставленные В.Г. Хандельвангом (W. G. Haldenwang, университет Техаса, США)

Плазмиды pBN104 (Nakamura et al., 1994) и pJF28 (Ромахина, 1991) обеспечивают экспрессию генов РНКазы Bsp и биназы II в клетках *B.subtilis*.

Культивирование бактерий проводили в колбах объемом 100мл при соотношении объема среды к объему колбы 1:7 на качалке с интенсивностью качания 200 об/мин при 37°C. Использовали питательные среды, оптимизированные для синтеза РНКаз: биназы I, (Знаменская и др., 1980), РНКазы Bsp и биназы II (получены в данной работе), синтетическую бесфосфорную среду (%): трис основной - 0,65; KCl - 5,0; NaCl - 0,1; (NH₄)₂SO₄ - 0,2; цитрат Na - 1,0; с добавлением 0,05% дрожжевого экстракта, среды для трансформации клеток и протопластов *B.subtilis* плазмидной ДНК (Гловер, 1988; Chang, Cohen, 1979).

Контроль роста культуры производили путем измерения оптической плотности суспензии при длине волны 590нм (ОП₅₉₀).

Среднюю удельную скорость роста культуры (μ) за время (t_1-t_0) рассчитывали по формуле: $\mu = (\ln m_1 - \ln m_0) / (t_1 - t_0)$, где m_0 - величина биомассы в начале, m_1 - в конце отрезка времени.

Среднюю удельную скорость синтеза ферментов (E) рассчитывали аналогичным образом.

Рибонуклеазную активность в культуральной жидкости определяли по количеству кислоторастворимых продуктов гидролиза РНК (Anfinsen et al., 1954; Лещинская и др., 1980).

Активность щелочных фосфомоно- и фосфодизстераз определяли по реакции гидролиза паранитрофенилфосфата и бис-паранитрофенилфосфата натрия (Несмеянова и др., 1966).

ДНКазную активность определяли по продуктам гидролиза ДНК, растворимым в 2% HClO_4 (Лещинская, 1980).

Специфическую активность ферментов рассчитывали как отношение общей активности фермента к величине биомассы.

Количество неорганического фосфата в среде определяли колориметрически по образованию фосфорно-молибденовой сини (Аринюшкина, 1970).

Трансформацию клеток *B. subtilis* плазмидными ДНК проводили по (Гловер, 1988).

Трансформацию протопластов *B. subtilis* плазмидными ДНК проводили по (Chang, Cohen, 1979).

Плазмиды выделяли щелочным методом (Bimboim, Doli, 1979), или с помощью колонки Qiagen-tip 100.

Выделение хромосомной ДНК проводили по (Маниатис и др., 1984).

Для выделения и очистки биназы II использовали ПЭГ-6000, ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе, гепарин-сефарозе и гель-фильтрацию на *tsk-gel toyopearl*.

Степень чистоты препарата и молекулярную массу фермента определяли электрофорезом в 12,5%-ном ПААГ в присутствии 0,1% DS-Na по методу Лаэммли (Laemmli, 1970).

Кинетические параметры гидролиза синтетических субстратов определяли при действии на poly(A), poly(I), poly(A)poly(U) и poly(I) poly(C) спектрофотометрическим методом.

Дот-блот гибридизацию проводили по (Dig DNA Labeling and Detection Kit Instruction Manual, 1999).

ДНК, меченную дигоксигенином (Dig-ДНК) создавали методом RC PCR (recombinant circle PCR) по (Jones and Howard, 1990).

Компьютерный анализ. Поиск генов, гомологичных генам исследуемых рибонуклеаз, проводили при помощи программ blastN и tblastN (Alschul et al., 1997). В качестве проб использовали нуклеотидные последовательности генов биназы II (AN X98086) и РНКазы Bsn (AN D01097). Сравнение двух нуклеотидных последовательностей между собой проводили с помощью программы "Blast two sequences tool" (Tatusova and Madden, 1999).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью математического аппарата программы Excel. Результаты многофакторных

экспериментов по подбору состава среды обрабатывали с помощью комплекса компьютерных программ "БИОПТ" (Краснов, Знаменская, 1992).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Анализ генов *birB* и *bsn*, кодирующих биназу II и РНКазу Bsp

При клонировании фрагмента хромосомы *B.intermedius* в клетках *B.subtilis* был обнаружен ген *birB*, кодирующий РНКазу - биназу II, который абсолютно отличается от гена *birA*, кодирующего биназу I, но сходен с геном *bsn* РНКазы Bsp из *B.subtilis*. Клонированный фрагмент хромосомы *B.intermedius* 7Р, помимо гена *birB*, содержит еще три гена: *fbiC*, *fbiD* и *atr* (Hahnen et al., 2000).

Мы провели сравнительный анализ генов РНКазы Bsp и биназы II. Было выявлено, что нуклеотидные последовательности генов РНКазы Bsp и биназы II обладают достаточно высокой степенью гомологии. Идентичность полных генов составляет 57%, идентичность кодирующих последовательностей составляет 66%. Белки отличаются по 67 аминокислотным остаткам (рис.1.). В пределах зрелого белка идентичность составила 73 %. Промоторы генов РНКазы Bsp и биназы II, а также сигнальные пептиды не проявляют гомологии.

Нами был проведен сравнительный анализ структуры промоторов биназы II и РНКазы Bsp, целью которого было обнаружение нуклеотидных последовательностей, определяющих регуляторные механизмы экспрессии генов этих РНКаз (рис.2). Промоторы генов биназы II и РНКазы Bsp содержат гексануклеотид, гомологичный консенсусной последовательности "-10 области" (5 из 6), которая узнается σ^A -фактором РНК-полимеразы. Выраженная "-35 область" отсутствует в обоих промоторах.

В промоторах обеих РНКаз обнаружены последовательности гомологичные сайтам узнавания регуляторного белка DegU двухкомпонентной регуляторной системы трансдукции сигнала DegS-DegU. Функционирование системы DegS-DegU стимулируется высокими концентрациями солей (Msadek et al., 1993; Dartois et al., 1998). Эта последовательность представляет собой участок промотора, содержащий два консервативных сайта, разделенных 11-13 нуклеотидами и имеет вид AGAAN₁₁₋₁₃TTCA(T)G. Гомология сайтов узнавания регуляторным белком DegU в промоторах генов *birB* и *bsn* составила 78% и 89%, соответственно.

Промотор гена *bsn* содержит области, частично гомологичные консенсусным последовательностям "-10" (6 из 7) и "-35" (6 из 7), узнаваемые σ^E -фактором РНК-полимеразы. В связи с этим можно было бы предположить взаимосвязь между спорообразованием и синтезом РНКазы Bsp. Вместе с тем, известно, что синтез ряда секретрируемых ферментов деградации, таких как ДНКазы и щелочная фосфатаза, регулируются σ^E -фактором РНК-полимеразы.


```

birII  MKRTLFGTVAAGIMIFGTLAAPLPPAANAQSFTLNEPSQTITFSPLQLQN 50
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
bsn    MTKKLWFLPIVCLFFILGWTAPSASAGAPADTNLYSRLAVSTAGGTTLFP 50
      ↓
birII  ETSAQQAATAATSQIDSYYQSANGKSGPALKKALHDIIDDHKQLSYSQVW 100
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
bsn    QTSS..AVITPSADTETYYKEASGKSGTALKSALHRIISGHTKLSYSQVW 98
      ↓
birII  DALKKIDEDPKNPSNVLLLYSGVSRSKQANGNVGQWNREHVWAKSHGNF 150
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
bsn    NALKETDEDPANPNNVILLYTQESRAKSKNGGSGVDWNREHVWAKSHGNF 148

birII  GTSQGPGTDLHHLRATDVQTNSTRGNLDFDLGGNEYKGPAGNFYDSDSFE 200
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
bsn    GTAAGPGTDIHHLRPADVQVNSARGNMDFDNGGSEYPKAPGNYYDGDSWE 198

birII  PHSRVKGDVARMLFYMAVRYEGDDRFPDLELNDKVNNGSAPLHGKMSVLL 250
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
bsn    PRDEVKGDVARMLFYMAVRYEGGDGYPDLELNDKTGNSAPYMGKLSVLL 248

birII  KWNKQDPVDQIERNRNEIYETQNNRNPFIDHFEWASAIWE 292
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
bsn    KWNKQDPVDSKEKRRNEIYEDYQHNRNPFIDHFEWADEIW. 289

```

Рис.1. Первичная структура РНКазы Bsn в сравнении с бинойзой II. Идентичные аминокислоты обозначены вертикальными линиями; N-конец ферментов обозначен вертикальными стрелками; лидерные и пре-про последовательности выделены курсивом.

Их промоторы также содержат участки, гомологичные сайтам узнавания для σ -фактора РНК-полимеразы. Однако прямой связи между процессом спорообразования и секрецией этих ферментов не было обнаружено.

Мы провели сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей областей, фланкирующих ген *bsn* на хромосоме *B.subtilis*, и фрагмента хромосомы *B.intermedius*, граничащего с геном *birB*. Оказалось, что гены *fbiC* и *fbiD* частично гомологичны генам *fhuB*, *fhuG*, *feuB* и *feuC* систем транспорта железа *B.subtilis*, входящим в опероны *fhu* и *feu*. Кроме того, Гены *fbiC* и *fbiD* содержат фрагменты, идентичные генам оперонов транспорта железа *E.coli* (*fecC*, *fecD*) и других бактерий и, вероятно, представляют собой 3'-фрагмент оперона транспорта ионов железа *B.intermedius*. Интересно, что опероны *fhu* и *feu* на хромосоме *B.subtilis* удалены от гена *bsn* на 75 и 3160 тпн, соответственно. Ген *bsn* граничит с 5'-конца с геном *yurG*, кодирующим аспарат аминотрансферазу, и *yurH*, кодирующим N-карбамаил-L-аминоацид амидогидролазу, а с 3'-конца - с геном *yurJ*, кодирующим множественный переносчик Сахаров, и *yurK*, кодирующим регулятор транскрипции.

Промотор гена биназы II (*B.intermedius* 7P, AN X98086)

G T - 3 5 A -10 S D Met
GAAT**TTTCAT**TACAT**AAAA**TTTACGATA**AAATCCAT**TTAT**TTCT**TTCTGACA**ATATGAT**AGAAATA**AAAGAGA**ATACATTCCCTATA**AGGAGG**AAATCGA**ATG**

Промоторгена РНКазы Bsn (*B.subtilis*, AN DO 1097)

A A(T) G C
TTTAAACTGAAAACTGACAAGATGATCT**TTT****AGAAGGAGC****TTT****GAGTT**CA**TTAT****TTT****TT**CCAAAAATCA

-35
ATGATTTTCCGGATACTTTGACCAAGAAACCGCCCTCTGTCCCATAGCCGAAGGAACCATTTTTCAAAAA**AGATAGA**ATA

-10 S D Met
TTAGATTTATTTTTTGGATAATAGAGGTA**AGGAGGG**CAAGTC**ATG**

Промоторгена биназы I (*B.intermedius* 7P, AN X53697)

-35 -10
TTCATCGAAGG**TTAT**CAAGGAAAAAGCCTCATTTTATAGCAAAGAACCTGT**TTCTTTAC**ATTTCC**TTCAT**GTTCGGGTGCTATA**ATAT**GAGGTA

Рис.2. Промоторы генов *birB* (биназы II), *bsn* (РНКазы Bsn) и *birA* (биназы I). Сайты инициации синтеза мРНК, -10 и -35 области, узнаваемые РНК-полимеразой с σ^A фактором, подчеркнуты. В промоторах генов *birB* и *bsn* выделены жирным шрифтом и подчеркнуты предполагаемые последовательности, узнаваемые регуляторным белком DegU. В промоторе генз *bsn* выделены жирным шрифтом и обведены предполагаемые -10 (6 из 7) и -35 (6 из 7) последовательности, узнаваемые σ^E фактором РНК-полимеразы. Участки промотора *birA*, соответствующие *pho* боксам, выделены жирным шрифтом и курсивом. Сайт узнавания для регуляторного белка DegU двухкомпонентной регуляторной системы трансдукции сигнала DegS-DegU (AGAAN₁₁₋₁₃TTCA(T)G). Канонические последовательности σ^E фактора: (-10) CATACHT и (-35) ZHATAXX, где H соответствует А или С, Z - Т или G, X - А или Т.

Сопоставление фланкирующих участков генов *bsn* и *birB* выявило их различие, что, вероятно, свидетельствует об эволюционных изменениях в локализации генов высокомолекулярных секретируемых РНКаз бацилл.

2. Скрининг представителей рода *Bacillus* на наличие в геноме нуклеотидных последовательностей, гомологичных генам высокомолекулярных секретируемых рибонуклеаз *B.intermedius* и *B.subtilis*

С целью скрининга представителей рода *Bacillus* на наличие в геноме последовательностей, гомологичных генам высокомолекулярных секретируемых рибонуклеаз *B.intermedius* и *B.subtilis*, была проведена дот-блот гибридизация гена биназы II с ДНК других видов бацилл: *B.thuringiensis*, *B.pumilus*, *B.polymixa*, *B.amyloliquefaciens*, *B.circulans*. В ходе работы был применен метод с нерадиоактивными мечеными нуклеиновыми кислотами, полученными с использованием гаптена дигоксигенина. Интенсивность хемилюминесценции свидетельствовала о том, что исследуемые ДНК *B.thuringiensis*, *B.circulans*, *B.polymixa* и *B.amyloliquefaciens* имеют последовательности, в некоторой степени гомологичные генам высокомолекулярных секретируемых рибонуклеаз *B.intermedius* и *B.subtilis* (рис.3.).

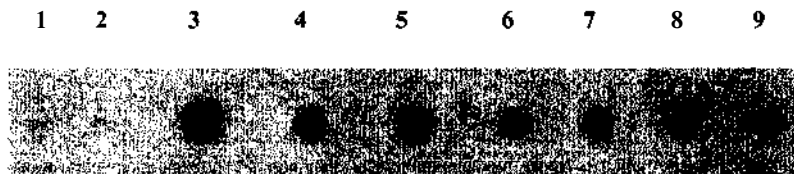


Рис.3. Дот-блот гибридизация гена биназы II (Dig-ДНК)

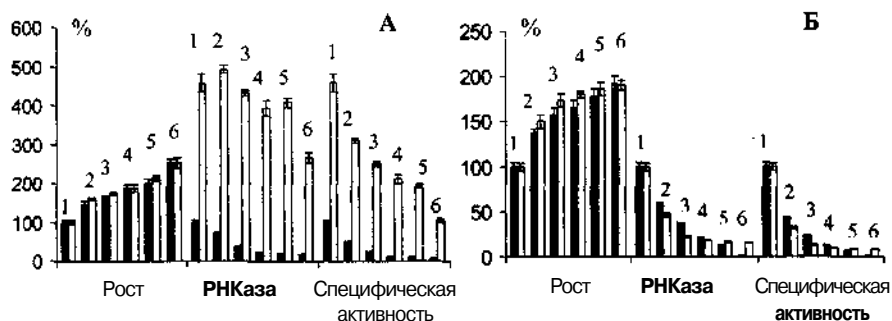
1 - с ДНК *E.coli*; 2 - с ДНК *Rhodobacter capsulatus*; 3 - с плазмидой pJF28;
4 - с ДНК *B.intermedius*; 5 - с ДНК *B.subtilis*; 6 - с ДНК *B.amyloliquefaciens*;
7 - с ДНК *B.thuringiensis*; 8 - с ДНК *B.polymixa*; 9 - с ДНК *B.circulans*

Кроме того, был проведен поиск гомологичных последовательностей с помощью компьютерной профаммы BLAST среди известных расшифрованных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей бацилл и других представителей бактерий, находящихся в базе данных международного Банка генов. Результаты поиска показали, что в недавно расшифрованном геноме *B.anthraxis*, содержится ген, кодирующий белок, на 67% идентичный РНКазе Bsn *B.subtilis* и биназе II

B.intermedius. Геном *Oceanobacillus iheyensis* содержит ген, кодирующий внеклеточную рибонуклеазу, идентичную на 62% РНКазе Bsn и на 64% биназе II. Интересно, что микроорганизм *Oceanobacillus iheyensis* был изолирован из глубоководных осадков и является экстремальным галотолерантом, существующим в условиях высоких концентраций солей (Takami et al., 2002)

3. Физиолого-биохимические механизмы регуляции синтеза высокомолекулярных рибонуклеаз *B.intermedius* и *B.subtilis*

Изучение регуляции синтеза РНКазы Bsn и биназы II начали с подбора оптимального состава питательных сред для образования РНКазы Bsn рекомбинантным штаммом *B.subtilis* 168 с плазмидой pBN104 (ген *bsn*), а также для синтеза биназы II рекомбинантным штаммом *B.subtilis* 3922 с плазмидой pJF28 (ген *birB*).



П *B.subtilis* 168 pBN104 • *B.subtilis* 168 П *B.subtilis* 3922 pJF28 ■ *B.subtilis* 3922

Рис.4. Влияние неорганического фосфата на синтез РНКазы Bsn штаммами *B.subtilis* 168 и *B.subtilis* 168 pBN104. За 100% приняты значения для *B.subtilis* 168 (А). Влияние Фн на синтез биназы II рекомбинантным штаммом *B.subtilis* 3922 pJF28. За 100% приняты значения, соответствующие контролю для *B.subtilis* 3922 и *B.subtilis* 3922 pJF28 (Б)

1-контроль, 2-Фн, 25 мкг/мл, 3-Фн, 50 мкг/мл, 4-Фн, 100 мкг/мл, 5-Фн, 20 мкг/мл, 6-Фн, 500 мкг/мл

Ранее было показано, что экспрессия генов, кодирующих большинство секретируемых гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл, активируется в условиях дефицита неорганического фосфата - Фн (Znamenskaya et al., 1995, 1999; Знаменская и др., 1998; Шульга и др., 2000). Учитывая этот факт предварительно исследовали влияние Фн среды на накопление РНКазы Bsn и биназы II в

культуральной жидкости штаммов *B.subtilis* 168 pBN104 и *B.subtilis* 3922 pJF28 (рис.4.).

Было показано, что увеличение концентрации Фн в среде культивирования повышает урожай клеток, однако снижает общую и специфическую активность биназы II в культуральной жидкости *B.subtilis* 3922 pJF28 и РНКазы Bsn как в исходном штамме-продуcente (*B.subtilis* 168), так и в рекомбинантном штамме *B.subtilis* 168 pBN104 (рис.4.). Поэтому в дальнейшем при оптимизации условий культивирования Фн не включили в состав питательных сред.

Оптимизацию питательных сред проводили путем последовательной постановки многофакторных экспериментов по плану В2, в которых варьировали концентрации основных компонентов — обедненного фосфатом пептона и глюкозы. Оптимальная среда для синтеза РНКазы Bsn включает (в %): пептон - 2,1, глюкозу - 1,0 и минеральные компоненты - Na_2HPO_4 - 0,04; CaCl_2 - 0,01; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,03; MnSO_4 - 0,01; NaCl - 0,3; для синтеза биназы II - пептон (2,0), глюкозу (1,4) и те же минеральные компоненты.

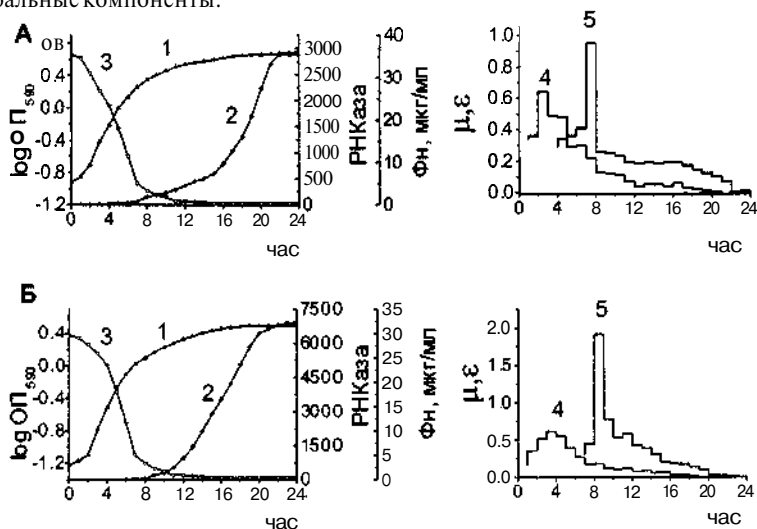


Рис.5. Динамика роста *B.subtilis* 168 pBN104 и синтеза РНКазы Bsn (А).

Динамика роста *B.subtilis* 3922 pJF28 и синтеза биназы II (Б).

1 - Биомасса (опт.ед); 2 - РНКазная активность в культуральной жидкости, опт.ед./мл·ч; 3 - потребление Фн (мкг/мл); 4 - удельная скорость роста культур (ц), час⁻¹; 5 - удельная скорость синтеза РНКаз (е), час⁻¹

Определение динамики роста *B.subtilis* 168 pBN104, *B.subtilis* 3922 pJF28 и накопления РНКаз Bsn и биназы II показало, что синтез обоих ферментов

осуществляется в стадию замедления роста культуры, когда Фн в среде практически полностью исчерпан и его концентрация составляет ~4 мкг/мл (рис.5.).

При подборе оптимального состава питательных сред было установлено, что присутствие Фн снижает РНКазную активность в культуральной жидкости обеих культур. Чтобы получить дополнительную информацию относительно репрессии синтеза РНКаз Bsn и биназы II неорганическим фосфатом и дерепрессии синтеза в условиях голодания по фосфору, был проведен анализ с использованием специфического ингибитора синтеза белка - хлорамфеникола. Добавление хлорамфеникола к культурам *B.subtilis*, *B.subtilis* 168pBN104 и *B.subtilis* 3922 pJF28, растущим в обедненной по фосфору среде, приводило к торможению как роста культур, так и накопления РНКаз Bsn и биназы II. Это означает, что фосфатное голодание индуцирует синтез РНКаз Bsn и биназы II *de novo*, т.е. происходит истинная дерепрессия синтеза, а не активация ранее синтезированных форм ферментов.

Таким образом, экспрессия генов *bsn* и *birB*, также как и генов, кодирующих большинство секретируемых гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл, подавляется избытком Фн в питательной среде. Известно, что в условиях дефицита Фн синтез биназы I, а также большинства других гуанилспецифичных рибонуклеаз находится под контролем двухкомпонентной регуляторной системы PhoP-PhoR (Znamenskaya et al., 1995; Знаменская Л.В., 1999б; Шульга и др., 2000; Вершинина и Знаменская, 2002). Однако, в отличие от промоторов генов гуанилспецифичных РНКаз бацилл, подверженных фосфатной регуляции, в промоторах обеих исследуемых высокомолекулярных РНКаз не было обнаружено гексануклеотидных последовательностей, гомологичных *pho*-боксу генов РНО регулона *B.subtilis*.

Ранее было установлено, что накопление гуанилспецифичных РНКаз бацилл активируется малыми дозами ингибитора транскрипции актиномина Д (АД) в условиях дефицита неорганического фосфата. В то же время синтез РНКазы *B.amyloliquefaciens* - барназы подавляется этим антибиотиком (Знаменская и др., 1984, 1994; Габдрахманова и др., 1997; Шульга и др., 2000). Мы установили, что внесение АД в период активации синтеза биназы II и РНКазы Bsn, т.е. в период замедления удельной скорости роста культур, вызывало увеличение синтеза РНКазы Bsn в 2,3 раза, а синтеза биназы II в 4,2 раза (рис.6). Изучение влияния малых доз АД на синтез биназы II и РНКазы Bsn при подавляющих синтез РНКаз концентрациях Фн показало, что активирующее действие АД на синтез РНКаз не является следствием снятия ингибирования фосфором, также как это было описано для гуанилспецифичных РНКаз.

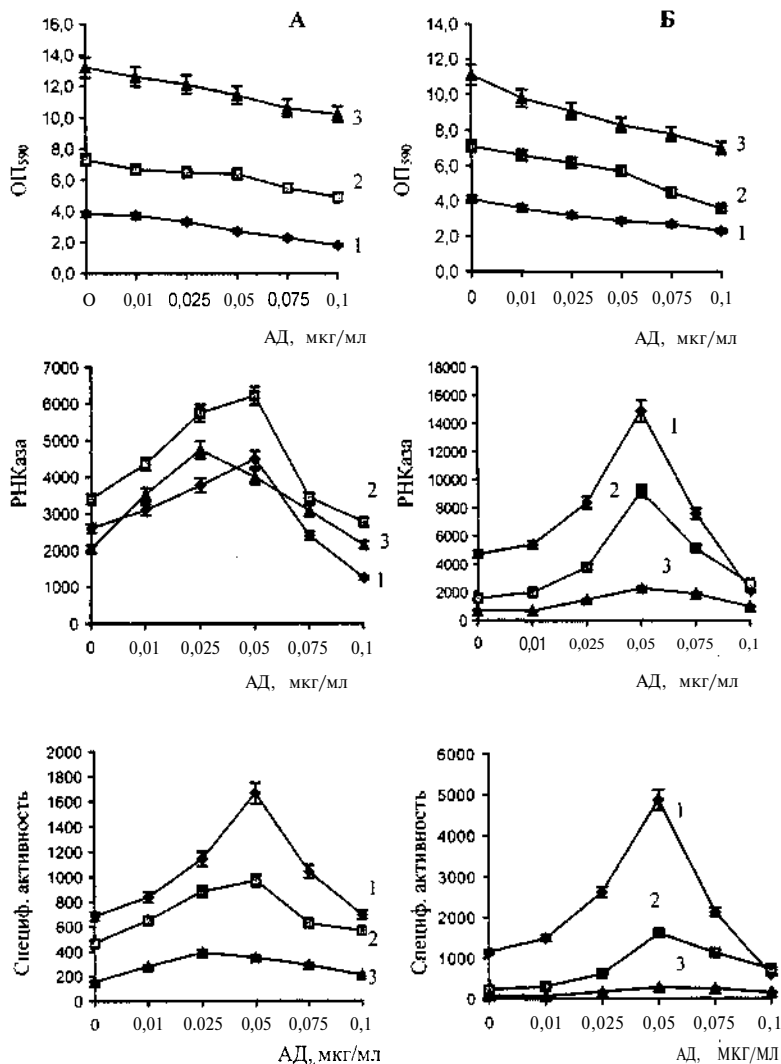


Рис.6. Влияние актиномицина Д на рост *B.subtilis* 168pBN104 и синтез РНКазы Vsp (А), а также на рост *B.subtilis* 3922 pJF28 и синтез биназы II (Б) в условиях различного содержания Фн в среде культивирования. 1 - контроль (без дополнительного Фн); 2 - Фн, 20 мкг/мл; 3 - Фн, 100 мкг/мл

4. Роль двухкомпонентной регуляторной системы трансдукции сигнала DegS-DegU и альтернативного σ^E -фактора РНК-полимеразы в регуляции экспрессии генов высокомолекулярных секретируемых РНКаз бацилл

Было обнаружено, что в промоторе гена РНКазы Bsp содержатся последовательности, частично гомологичные консенсусным последовательностям узнавания σ^E -фактором РНК-полимеразы, который специфичен к ранним *spo*-генам. Можно было бы сделать предположение о взаимосвязи начальных этапов спорообразования и синтеза РНКазы Bsp. Однако известно, что, по крайней мере, два класса внеклеточных гидролаз бактерий (ДНКазы и фосфатазы) являются частью σ^E - регулона (Errington, 1993). Причем эти ферменты непосредственно не вовлечены в споруляционный процесс. Нами было показано, что спорообразование у штаммов *B.subtilis* RL1059 и *B.subtilis* 168 начинается в период снижения удельной скорости синтеза РНКазы Bsp в благоприятной для спорообразования среде и в глубокой стационарной фазе на оптимизированной для синтеза РНКазы Bsp среде. Это свидетельствует о том, что синтез РНКазы Bsp осуществляется вегетативными клетками и не связан со спорообразованием.

Для того чтобы проверить возможность регуляции экспрессии гена РНКазы Bsp альтернативным σ^E фактором был использован штамм *B.subtilis* Sec84, мутантный по гену *sigE*. Изучение синтеза РНКазы Bsp мутантным штаммом показало, что альтернативный σ^E -фактор не задействован в регуляции синтеза РНКазы Bsp.

Проведенный нами подробный анализ структуры регуляторных элементов генов РНКазы Bsp и биназы II выявил в них последовательности, гомологичные сайтам узнавания регуляторного белка DegU двухкомпонентной регуляторной системы трансдукции сигнала DegS-DegU, контролирующей синтез у *B.subtilis* ряда гидролаз (левансахараза, щелочная и металлопротеаза, альфа-амилаза и бетта-глюконазы) в условиях солевого стресса. Исследование влияния высоких концентраций хлорида натрия (от 0,5 М до 4 М) и цитрата натрия (от 0,05 М до 2 М) на образование РНКаз показало повышение уровня их синтеза в 2,6 - 8,3 раза.

Для изучения экспрессии гена Bsp были использованы мутантные штаммы *B.subtilis*, дефектные по регуляторным белкам DegS и DegU двухкомпонентной системы трансдукции сигнала. Чтобы выяснить, является ли экспрессия генов РНКазы Bsp и биназы II в штаммах *B.subtilis* зависимой от этих белков, были применены мутантные штаммы *B.subtilis* 8G5 *degS-degU* (характеризуется пониженным синтезом гидролаз) и *B.subtilis* 8G5 *degU32(Hy)* (характеризуется увеличением продукции этих ферментов). Чтобы исследовать закономерности синтеза биназы II в штаммах *B.subtilis* была произведена их трансформация плазмидой pJF28. Поскольку мутация *degU(Hy)* помимо усиления синтеза

ферментов деградации ведет к снижению генетической компетенции, для внедрения плазмиды pJF28 в клетки *B.subtilis* была использована методика трансформации протопластов.

Штаммы выращивали на средах, оптимизированных для синтеза РНКаз, с добавлением 2М хлорида натрия и без него. Штаммы *B.subtilis* 8G5, а также *B.subtilis* 8G5 pJF28 были использованы в качестве контроля. Установлено, что в контрольных штаммах синтезируются оба фермента, причем на среде с добавлением NaCl наблюдается значительное увеличение синтеза РНКаз. В штаммах *B.subtilis* 8G5 *degS-degU* синтез биназы II и РНКазы Bsp находится на низком уровне, как на оптимизированных средах, так и на среде с добавлением NaCl. В то же время синтез РНКазы Bsp и биназы II штаммом *B.subtilis* 8G5 *degU32*(Hy) в 2,5 и 2,0 раза превышает уровень синтеза этих ферментов контрольными штаммами на оптимизированных средах (рис. 7.).

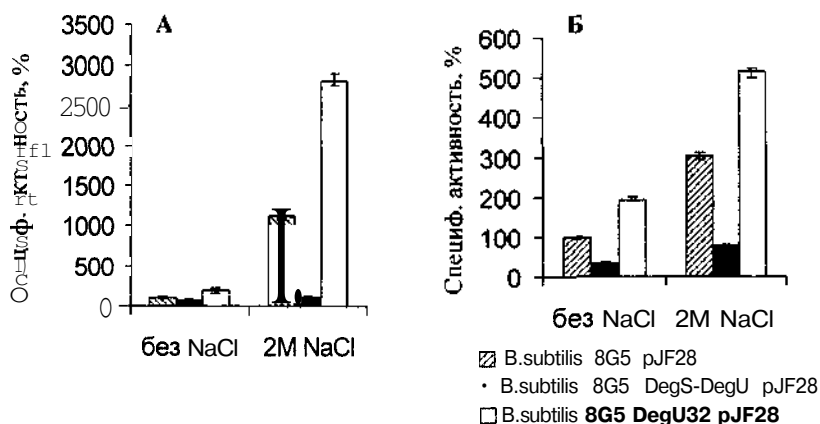


Рис.7. Влияние белков DegS и DegU на регуляцию экспрессии генов РНКазы Bsp (А) и биназы II (Б) в условиях солевого стресса

Таким образом, были получены результаты, подтверждающие предположение, что регуляция синтеза РНКазы Bsp и биназы II осуществляется через систему двухкомпонентных белков трансдукции сигнала DegS-DegU.

5. Выделение биназы II из культуральной жидкости рекомбинантных штаммов *B.subtilis*

Представлялось интересным провести выделение биназы II *B.intermedius* 7P и охарактеризовать данный фермент, который по структуре гена существенно отличается от биназы I, являющейся гуанилспецифичной циклизующей РНКазой.

Поскольку в культуральной жидкости *B. intermedius* на фоне доминирующей РНКазы - биназы I, сложно определить присутствие дополнительной РНКазной активности, нами был использован рекомбинантный штамм *B.subtilis* 3922 pGF28, несущий ген биназы II. В рекомбинантных штаммах ген биназы II достаточно активно экспрессируется с плазмиды pJF28, которой был трансформирован штамм *B.subtilis* 3922 с низким уровнем РНКазной активности.

Разработка схемы выделения и очистки биназы II из культуральной жидкости *B.subtilis* 3922 pJF28 складывалась из следующих этапов: теоретический анализ первичной структуры и свойств белка; изучение влияния pH культуральной жидкости на активность фермента; выбор метода концентрирования фермента из культуральной жидкости; выбор сорбентов, условий сорбции и элюции фермента.

Учитывая результаты предварительных исследований и данные литературы, нами была предложена схема выделения биназы II, включающая в себя осаждение белка полиэтиленгликолем, хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе и гепарин-сефарозе, концентрирование на ДЭАЭ-целлюлозе и гель-фильтрацию на *tsk-gel* toyopearl - HW50. В результате выделения белка по предложенной нами схеме удалось очистить фермент в 141,2 раза. Выход по активности составил 1,74%.

Схема выделения, разработанная Накамурой с соавторами (1992) для очистки внеклеточной **рибонуклеазы** *B.subtilis* Bsn, позволяла очистить этот фермент лишь в 2,8 раза, при этом выход по активности составлял 2%, наиболее значительные потери происходили на первых этапах очистки. Низкий выход, полученный при выделении обоих ферментов — биназы II и РНКазы Bsn, объясняется лабильностью белков, что усложняет процедуру выделения высокомолекулярных **секретируемых** РНКаз.

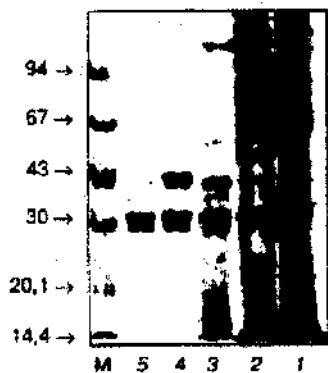


Рис.8. Электрофорез белковых растворов на различных стадиях очистки биназы II из культуральной жидкости *B.subtilis* pJF28 (ген *birB*) в полиакриламидном геле с Ds-Na: 1 - культуральная жидкость, 2 — препарат после осаждения полиэтиленгликолем, 3 - препарат после хроматографии на ДЭАЭ - целлюлозе, 4 - препарат после хроматографии на гепаринсефарозе, 5 - препарат после гель-фильтрации; М - маркерные белки (слева их молекулярные массы в кДа): фосфорилаза В (94 кДа), БСА (67 кДа), овальбумин (43 кДа), карбоангидраза (30 кДа), соевый ингибитор трипсина (20,1 кДа), α-лактальбумин (14,4 кДа)

Степень чистоты и молекулярную массу фермента определяли с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии SDS-Na (рис.8.). Молекулярная масса биназы II около 30 кДа и, подобно РНКазе Bsp, белок проявляется в ПААГ в виде двух связанных линий. Вероятно это объясняется тем, что биназа II как и Bsp, подвергается офаниченному протеолизу, который происходит в процессе секреции белка. Спектральные характеристики препарата белка составили: $\lambda_{\max}=280$ нм и $\lambda_{\min}=258$ нм. Таким образом, был получен электрофоретически и функционально гомогенный белок.

Были изучены физико-химические и каталитические свойства очищенного фермента. Обнаружено, что оптимальной является pH 8,5 (рис.9.). Тот же оптимум pH определен для внеклеточной рибонуклеазы *B.subtilis* (Nakamura et al., 1992). Кроме того было установлено, что биназа II, подобно своему гомологу, активируется ионами Mg^{2+} и ингибируется ЭДТА (табл. 1.).

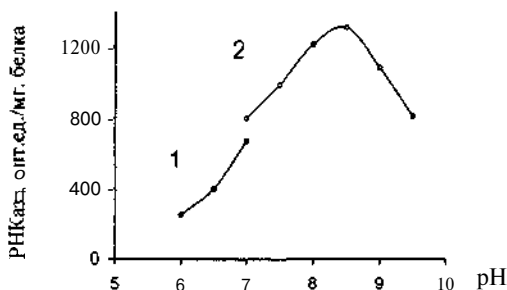


Рис.9. Зависимость активности очищенной биназы II от pH реакционной смеси:

- 1 - фосфатный буфер,
- 2 - трис-НСl-буфер

Таблица 1

Влияние ионов Mg^{2+} и ЭДТА на активность биназы II в культуральной жидкости и в очищенном образце (за 100% (контроль) принята активность биназы II при инкубации в 0,1 М Tris-НСl-буфере, pH 8,5)

Препарат	Активность РНКазы, %;		
	контроль	Mg^{2+} , 1 мМ	ЭДТА, 10 мМ
Культуральная жидкость	100	137,0	49,8
Очищенный фермент	100	288,0	2,9

Исследовано действие биназы II на различные синтетические субстраты и обнаружено, что данный фермент, в отличие от биназы I, предпочитает poly(A) и не действует на poly(I). Вместе с тем это указывает на сходство биназы II с рибонуклеазой V1 из яда азиатской кобры (Kean and Drapper, 1985) и РНКазой II

E.coli (Shen and Shlessiger, 1982), образующих при расщеплении РНК продукты с 5'-терминальным фосфатом, которые также не действуют на poly(I) и с высокой скоростью расщепляют poly(A). При этом бимолекулярные константы скорости биразы II и рибонуклеазы VI примерно соответствуют друг другу.

Таблица 2

Кинетические параметры реакций расщепления синтетических полинуклеотидов биразой II

Субстрат	k_{cat} , с ⁻¹	K_m , мкМ	k_{cat}/K_m , М ⁻¹ ·с ⁻¹
poly(I) poly(C)	110	59	$1,9 \cdot 10^6$
poly(A) poly(U)	270	50	$5,4 \cdot 10^6$
poly(A)	210	400	$5,2 \cdot 10^5$

Отличие в скоростях расщепления одно- и двунитевых полирибонуклеотидов свидетельствует о том, что бираза II связывает субстрат в двуспиральной конформации. Аналогичное заключение было сделано ранее при исследовании РНКазы VI из яда кобры.

Настоящая работа посвящена характеристике высокомолекулярных секретрируемых РНКаз - РНКазы Bsn и биразы II, которые синтезируются двумя видами бацилл *B.subtilis* и *B.intermedius* соответственно. Опираясь на результаты изучения синтеза РНКазы Bsn и биразы II в нативных и мутантных штаммах *B.subtilis*, нами показана регуляция экспрессии генов этих РНКаз в условиях солевого стресса двухкомпонентной регуляторной системой трансдукции сигнала DegS-DegU. Несмотря на то, что образование обеих высокомолекулярных РНКаз, подобно большинству низкомолекулярных гуанилспецифичных РНКаз, происходит в условиях дефицита Фн в среде и активируется малыми дозами АД, двухкомпонентная сенсорно-сигнальная система PhoP-PhoR не участвует в регуляции их синтеза.

В результате изучения свойств очищенной нами биразы II установлено, что подобно РНКазе Bsn, фермент активируется ионами Mg^{++} и ингибируется ЭДТА, что отличает высокомолекулярные рибонуклеазы от гуанилспецифичных, которые не требуют ионов металлов для проявления активности. Кроме того, обнаружено, что в отличие от биразы I, бираза II при расщеплении синтетических субстратов предпочитает poly(A), практически не действуя на poly(I), и связывает субстрат в двуспиральной конформации. Впервые было обнаружено, что *B.intermedius* не является единственным представителем *Bacillus*, который секретирует оба типа

рибонуклеаз.

Известно, что большинство бактериальных рибонуклеаз, расщепляющих субстрат с образованием продуктов с 5'-терминальным фосфатом, являются внутриклеточными ферментами, участвующими в процессинге предшественников рРНК, тРНК, мРНК и в процессах репликации ДНК, репарации и транскрипции. Функция секретируемых 5'-фосфат образующих РНКаз не установлена. Вероятно, для полноценной жизнедеятельности многих спорообразующих бактерий необходимы оба типа рибонуклеаз - 3'-фосфат образующие циклизующие гуанилспецифичные РНКазы и 5'-фосфат образующие высокомолекулярные рибонуклеазы.

Таким образом, в результате нашей работы получены новые знания, которые расширяют представления о регуляции синтеза и физико-химических свойствах высокомолекулярных РНКаз спорообразующих бактерий, а также о распространении подобных ферментов у различных представителей рода *Bacillus*.

ВЫВОДЫ

1. Впервые с помощью дот-блот гибридизации гена биназы II с ДНК других видов бацилл, а также данных анализа известных аминокислотных и нуклеотидных последовательностей, показано наличие нуклеотидных последовательностей, гомологичных генам высокомолекулярных РНКаз Bsp и биназы II, у других видов бацилл - *B.thuringiensis*, *B.circulans*, *B.polymixa*, *B.amyloliquefaciens*, *B.anthraxis* и *Oceanobacillus iheyensis*

2. Синтез высокомолекулярных секретируемых рибонуклеаз — биназы II и РНКазы Bsp в рекомбинантных штаммах *Bacillus subtilis* осуществляется в стадию замедления роста культур при дефиците неорганического фосфата в среде, также как и синтез большинства низкомолекулярных гуанилспецифичных РНКаз

3. Ингибитор транскрипции - актиномицин Д в малых дозах активирует синтез высокомолекулярных секретируемых рибонуклеаз - Bsp и биназы II, что не является следствием снятия ингибирования синтеза фермента неорганическим фосфатом

4. Промоторы генов РНКазы Bsp и биназы II содержат последовательности, характерные для сайта связывания белка-регулятора DegU двухкомпонентной регуляторной системы трансдукции сигнала DegS-DegU. С использованием дефектных по регуляторным белкам штаммов показано, что экспрессия генов этих РНКаз в клетках *B.subtilis* регулируется на уровне транскрипции белками DegS и DegU сенсорно-сигнальной системы, которая индуцируется в условиях солевого стресса

5. При изучении синтеза РНКазы Bsn в штамме *Bacillus subtilis*, дефектном по гену sigE, установлено, что синтез происходит независимо от σ^E -фактора РНК-полимеразы, несмотря на наличие в промоторе последовательностей, гомологичных сайтам узнавания σ^E -фактора.

6. Разработан метод выделения электрофоретически и функционально гомогенной биназы II, включающий осаждение белка полиэтиленгликолем, хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе, гепарин-сефарозе, концентрирование на ДЭАЭ-целлюлозе и гель-хроматографию.

7. Исследуемая РНКазы — биназа II по основным свойствам аналогична РНКазе Bsn: имеет рН оптимум действия - 8.5; активируется ионами Mg^{2+} и необратимо ингибируется ЭДТА. Биназа II расщепляет poly(A) и не действует на poly(I), в отличие от биназы I, предпочитающей poly(I). Разница в скоростях расщепления одно- и двунитевых синтетических полирибонуклеотидов свидетельствует о том, что биназа II предпочитает субстрат в двуспиральной конформации.

Публикации по теме диссертации:

1. Знаменская Л.В., **Скворцова М.А.**, Каюмов А.Р.. Новые секретируемые РНКазы из *Bacillus intermedius* и *Bacillus subtilis* //Вестник Нижегородского университета им. Лобачевского, серия "Биология". - 2001. - вып. 1(3). - С. 60-66.
2. **Скворцова М.А.**, Бочаров А.Л., Яковлев Г.И., Знаменская Л.В.. Новая внеклеточная рибонуклеаза из *Bacillus intermedius* биназа II. выделение и некоторые свойства фермента //Биохимия. - 2002. - Т.67, №7. - С. 967-972.
3. Знаменская Л.В., **Харитонов М.А.**, Каюмов А.Р., Краснов С.И. Биосинтез новых высокомолекулярных секретируемых рибонуклеаз из *Bacillus intermedius* и *Bacillus subtilis* //Микробиология. - 2002. - Т.71, № 6 - С.801-808.
4. **Kharitonova M.**, Znamenskaya L., Leshchinskaya I. Production of high-molecular-weight ribonuclease Bsn from the recombinant strain of *Bacillus subtilis* //Medical Science Monitor. - 2003. - V.9, №7. - P.283-288.
5. **Скворцова М.А.**, Каюмов А.Р. Новая рибонуклеаза из *B.intermedius* - биназа II /Тезисы докладов XXXVIII международной научной студенческой конференции "Студент и научно-технический прогресс". - Новосибирск, 2000. - С.98-99.
6. **Скворцова М.А.** Первичная характеристика рибонуклеазы из *B.intermedius* — биназы II /Тезисы докладов конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам "Ломоносов 2000". - Москва, 2000. - С.65-66.

7. **Скворцова М.А.**, Знаменская Л.В. Биназа II: новая внеклеточная рибонуклеаза *B.intermedius* /Тезисы докладов научной конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КГУ "Материалы и технологии XXI века". - Казань, 2000. - С. 89-90.
8. **Скворцова М.А.**, Каюмов А.Р. Условия синтеза внеклеточной высокомолекулярной РНКазы из *Bacillus intermedius* в рекомбинантном штамме *Bacillus subtilis* /Тезисы докладов 5-й пушкинской конференции молодых ученых "Биология - наука 21^{го} века". - Пушкино, 2001. - С.53-54.
9. **Скворцова М.А.**, Каюмов А.Р. Марьяхина Т.Ф. Биосинтез внеклеточной высокомолекулярной РНКазы из *Bacillus intermedius* в рекомбинантном штамме *Bacillus subtilis* /Тезисы докладов XXXIX международной научной студенческой конференции "Студент и научно-технический прогресс". - Новосибирск, 2001. — С.32-33.
10. **Харитонов М.А.**, Каюмов А.Р. Марьяхина Т.Ф., Знаменская Л.В. Биосинтез и выделение высокомолекулярной секретируемой рибонуклеазы биназы II из *Bacillus intermedius* /Тезисы докладов IV научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Республики Татарстан. - Казань, 2001. - С. 118.
11. **Скворцова М.А.**, Каюмов А.Р. Марьяхина Т.Ф., Знаменская Л.В. Оптимизация условий биосинтеза внеклеточной высокомолекулярной РНКазы из *Bacillus intermedius* в рекомбинантных штаммах *Bacillus subtilis* /Тезисы докладов научной конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КГУ "Материалы и технологии XXI века". - Казань, 2001. -С. 96-97.
12. **Харитонов М.А.** Скрининг представителей рода *Bacillus* на наличие генов, гомологичных генам высокомолекулярных секретируемых рибонуклеаз *B.intermedius* и *B.subtilis* /Тезисы докладов 7-й пушкинской конференции молодых ученых "Биология - наука 21^{го} века". - Пушкино, 2003. - С.41-42.
13. **Kharitonova M.A.** and Znamenskaya L.V. New secretory high-molecular-weight ribonucleases from *Bacillus* /*Bacillus* Satellite Symposium at FEMS Congress 29th June - 3rd July. - Ljubljana, Slovenia, 2003. - P.29.